

西洋わさびペルオキシダーゼの肝細胞内輸送と 胆汁内排泄に及ぼす各種薬物の影響

山口 潤 小山田正人 小川 勝 洋

札幌医科大学病理学第2講座 (主任 森 道夫 教授)

Cytochemical Studies on the Process of Biliary Transport of Horseradish Peroxidase in Rat Hepatocytes and the Influence of Inhibitors on Its Transport

Jun YAMAGUCHI, Masahito OYAMADA
and Katsuhiko OGAWA

*Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. M. Mori)*

The process of transcellular transport of plasma proteins was investigated. We examined electron microscopically the process of uptake, intracellular transport and biliary excretion of intravenously injected horseradish peroxidase (HRP, 10 mg/100 g body weight) after 3'-3-diaminobenzidine (DAB) cytochemistry, using Wistar rats. Cytochemical features of vesicles carrying HRP were investigated by enzyme cytochemistry specific for plasma membrane (5'-nucleotidase), endoplasmic reticulum (glucose-6-phosphatase), Golgi apparatus (thiamine pyrophosphatase) and GERL (Golgi apparatus associated ER from which lysosomes arise) and lysosomes (acid phosphatase) followed by DAB cytochemistry.

HRP first appeared in the coated pits and coated vesicles of hepatocytes facing the space of Disse. HRP was then transported through the cytoplasm of the hepatocyte to the bile canaliculi via the smooth-surfaced vesicles or tubules and finally excreted into the bile by exocytosis. A few coated vesicles were 5'-nucleotidase positive, suggesting that HRP was taken up by the hepatocyte through the invagination of the plasma membrane. On the other hand, HRP-containing vesicles and tubules were negative in the glucose-6-phosphatase, thiamine pyrophosphatase and acid phosphatase, indicating that HRP does not pass through such cytoplasmic organelles as endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, GERL and lysosomes.

To confirm these observations, we examined the effects of monensin and chloroquine on the biliary excretion of HRP. Monensin administration (3.5 mg/100 g) induced a dramatic deformity of the Golgi apparatus, whereas chloroquine treatment (5 mg/100 g) caused a marked vacuolation of lysosomes. However, both of them did not affect the bile flow and biliary excretion of HRP.

The role of cytoskeleton on the biliary excretion of HRP was investigated by using specific inhibitors for microtubules (colchicine) and microfilaments (cytochalasin). Colchicine treatment (0.3 mg/100 g) reduced the number of cytoplasmic microtubules in hepatocytes and significantly lowered the biliary excretion of HRP without changing the bile flow. Continuous cytochalasin B infusion for 2 hours (330 μ g/hr) induced a dilatation of bile canaliculi and a marked decrease in the bile flow. However, even with a loss of pericanalicular microfilaments, biliary excretion of HRP was not affected. These results indicate that the transcellular transport of HRP is dependent on the cytoplasmic microtubule network of hepatocyte, but not on the microfilament system, which is important in the maintenance of bile flow.

(Received May 27, 1985 and accepted June 10, 1985)

Key words: Horseradish peroxidase (HRP), Bile secretion, Vesicular transport, Cytoskeleton

1 緒 言

近年、胆汁中に多種類の蛋白質が含まれることが明らかにされて来た^{1,2)}。その量は胆汁の乾燥重量の5%を占めるといわれる³⁾。その中には代表的な血漿蛋白であるアルブミン⁴⁾や免疫グロブリン⁵⁻⁷⁾(IgA や IgG)などのほか、インスリン^{8,9)}, carcinoembryonic antigen (CEA)¹⁰⁾などの生理的ないし病的に血中に出現する蛋白質が含まれている。これらの事実から、肝細胞が血中の蛋白質を取り込んで胆汁中に排泄する機構を持つ可能性が示唆されているが、その詳細については未だ明らかにされていない。

たとえばIgA¹¹⁾, インスリン¹²⁾については、アイソトープでラベルしたこれらの蛋白質を生化学的及び電顕レベルのオートラジオグラフィで検索した結果から、これらの蛋白質が表面にリボソームを持たない小胞(vesicle)を介して肝細胞内を移動し、毛細胆管に排泄されると報告されている。しかし、遠心分離による小器官の分画では多少のコンタミネーションが避けられず、一方電顕的オートラジオグラフィでは銀粒子が微細構造を被うため、これらのvesicleの詳細は明らかにされていない。

西洋わさびペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase, 以下 HRP)は分子量約4万の糖蛋白で、Graham and Karnovsky¹³⁾の3-3'-diaminobenzidine (以下 DAB)を用いた酵素組織化学で容易に光学顕微鏡、電子顕微鏡下に同定されるため、トレーサーとして血管や組織の透過性の検索に広く用いられている¹³⁻¹⁹⁾が、血中に投与された HRP の一部は肝細胞に取り込まれ^{20,21)}、胆汁中に排泄されることが知られている^{22,23)}。そこで本研究では、HRP 投与後のラット肝細胞について DAB 反応を行ない、HRP の肝細胞内輸送経路を追跡する一方、DAB と細胞膜のマーカー酵素である 5'-nucleotidase (AMP ase), 肝細胞小胞体のマーカー酵素である glucose-6-phosphatase (G6P ase), ライソソーム及び GERL のマーカー酵素である acid phosphatase (acPase) 及びゴルジ装置(trans 側の cisterna)のマーカー酵素である thiamine pyrophosphatase (TPPase) の 2 重酵素組織化学を行ない、電顕的に HRP の肝細胞内輸送経路と、これらの小器官との関連を検索した。一方、特定の小器官を障害する事が知られているコルヒチン(細胞質微小管)²⁴⁻²⁷⁾, サイトカラシン(アクチンフィラメント)²⁸⁾, モネンシン(ゴ

ルジ装置)^{29,30)}, クロロキン(ライソソーム)³¹⁾などの薬物を投与した動物について、胆汁量及び胆汁内に排泄される HRP 量を測定し、これらの小器官と HRP の細胞内輸送の関係について検討した。

2 材料と方法

体重 300~400 g のウイスター系雄ラット 50 匹を用いた。

2.1 組織化学的方法

HRP (Sigma 社, type II, USA) を 100 mg/ml の生理食塩水に溶解し、体重 100 g あたり 10 mg の割合でエーテル麻酔下の動物に静脈内投与した。投与後 1, 5, 10, 30, 60 分のラット肝を、門脈から生理食塩水を毎分 7~8 ml の割合で流し類洞内の血液を洗い流した後、0.1 M カコジル酸緩衝液で pH を 7.4 に調整した室温の 1.25%グルタルアルデヒド液(Ladd 社, USA)で 2~3 分間灌流固定した。

HRP の肝細胞内局在を検索するために、灌流固定した肝臓をさらに 4℃の 2.5%グルタルアルデヒド液で 2 時間固定し、0.2 M の蔗糖を加えた 4℃の 0.1 M カコジル酸緩衝液でひと晩洗浄した後、ビブラトーム(Oxford 社, USA)で 40 μm の非凍結切片を作製し、DAB 液に 37℃30 分間反応させた。AMPase, G6Pase 及び TPPase の検出には灌流固定した肝の、acPase の検出には灌流固定後さらに 2.5%のグルタルアルデヒドで 3 時間固定した肝のビブラトーム切片を用い、先ず Wachstein and Meisel^{32,33)}の AMPase 基質 adenosine monophosphate sodium (Sigma 社)³²⁾, G6Pase 基質 glucose-6-phosphate potassium (Sigma 社)^{33,34)}, Novikoff and Goldfischer³⁵⁾の TPPase 基質 thiamine pyrophosphate chloride (Sigma 社)³⁵⁾ないし acPase 基質 cytidine 5'-monophosphoric acid (Sigma 社)³⁶⁾に 30 分(TPPase のみ 90 分)反応させ、4℃の 7.5%蔗糖液で洗浄後、上記の DAB 基質に再び 37℃で 30 分間反応させた。

酵素組織化学を終えた後 1%オスミウム液で後固定し、Farquhar and Palade³⁷⁾のウラニルリンスで 1 時間後処理した後、脱水、エポン包埋した。超薄切片をクエン酸鉛で 1~2 分染色し電顕的に観察した。

2.2 胆汁の採取

体重 100 g あたり 5 mg のペン Tobal ビタール(Nembutal)で麻酔したラットの総胆管に、長さ 30 cm の NE-10 ポリエチレンチューブを挿入し、その先端か

ら胆汁が落下した時点をゼロ点として、5分後に体重100 gあたり10 mgのHRPを静注した。1時間目までは15分ごと、2時間目までは30分ごとに、あらかじめ重量を測定した試験管内に胆汁を採取し、重量測定を行ない、時間毎の胆汁量を1 ml/1 gと仮定して重量から算出した。胆汁中のHRP量は、そのペルオキシダーゼ活性を利用したWillstatter and Stoll³⁸⁾の方法にしたがって、スペクトロフォトメーター(Varian Techtron)の波長420 μ mにおける吸光度で活性を測定し、重量に換算し求めた。

2.3 薬物投与のHRP排泄への影響

コルヒチン(半井化学 特級)は0.3 mg/mlの割合で生理食塩水に溶解し、体重100 gあたり0.3 mgを胆汁採取4時間前に腹腔内投与した。対照群には同量のルミコルヒチンを投与した。クロロキン(Sigma 社)は5 mg/mlの割合で生理食塩水に溶解し、体重100 gあたり5 mgを6時間前に腹腔内投与した。対照群には同量の生理食塩水を投与した。モネンシン(Calbiochem 社)は3.5 mg/mlの割合で10%エタノール溶液に溶解し、体重100 gあたり3.5 mgを胆汁採取6時間前に腹腔内投与した。対照としては同量のエタノールを投与した動物を用いた。サイトカラシンB(Aldrich Chemical 社)は265 μ g/mlの割合で0.2% dimethyl sulfoxide (DMSO) 生理食塩水に溶解し、門脈から自動注入装置(夏目製作所)を用いて、1.1 ml(330 μ g)/hrの速度で持続注入した。対照群には0.2% DMSO 生理食塩水を同様に投与した。なお、これらの基質の投与条件については、*in vitro*の系で用いられている量を参考に予備実験を行ない、それぞれの薬物のターゲットとなる小器官の明らかな超微構造上の変化を認め、他の小器官には変化を認めない条件を設定した。

3 結 果

3.1 HRPの肝細胞内輸送経路

HRP投与後1分、5分、10分の肝細胞では、Disse腔面におけるHRPの盛んな取り込みの状態が観察された。HRPは肝細胞表面のcoated pitと肝細胞内のcoated vesicle³⁹⁾に認められた(Fig. 1)。一方Fig. 1及びFig. 2に示すように、細胞膜から離れた部分ではcoated vesicleは数を減じ、HRPはcoatを持たない膜系の内腔に見出された。これらの膜系は直径30~50 nmのvesicleとして観察されることが多いが、まれに、直径30~50 nmで、長さが1 μ mに達するC字型ないし桿状のtubuleとしても観察された。HRPをいれたC字型のtubuleの一部にcoatが観察されることもあった。

しかしHRPが粗面及び滑面小胞体やゴルジ装置の腔内に存在する所見は得られなかった(Fig. 3)。ライソソームは、対照群でもしばしば電子密度の高い物質を含むため、HRPがその中に存在するか否かを確かめることは困難であった。HRPをいれたvesicleやtubuleは、しばしば肝細胞のlateral membraneに接近して見出されたが、細胞間隙にはHRPは認められなかった。HRPをいれたtubuleに接して、しばしば微小管が観察された(Fig. 4)。HRP投与後10分以降の肝細胞では、毛細胆管周囲の多数のvesicleやtubule中にHRPが見出され、これらのvesicleやtubuleが毛細胆管膜と融合して、HRPが毛細胆管に排泄される様子が観察された(Fig. 5)。

3.2 HRP輸送経路の酵素組織化学的検討

AMPaseの反応産物は、Disse腔に面する肝細胞の細胞膜に陽性に認められた。AMPaseとDABの二重染色では、HRPをいれたcoated vesicleの幾つかのものにAMPaseの反応産物が証明されたが、多くのcoated vesicleはAMPase陰性であった(Fig. 6)。HRPをいれたcoatを持たないvesicleやtubuleは、AMPase陰性であった。一方肝細胞小胞体のマーカー酵素であるG6Paseの反応産物は、粗面及び滑面小胞体の内腔に証明されたが、HRPをいれたvesicleやtubuleにはG6Pase活性は認められなかった(Fig. 7)。TPPaseの反応産物はゴルジ装置のtrans側のcisternaに強陽性に認められたが、HRPをいれたvesicleやtubuleには認められなかった(Fig. 8)。acPase活性はライソソーム及びNovikoff⁴⁰⁾のいうGERLに見出された。しかしacPase陽性の小器官にはHRPの陽性所見はなく、逆にHRPをいれたvesicleやtubuleにはacPaseの反応産物は認められなかった(Fig. 9)。

3.3 HRPの胆汁内排泄に対する各種薬物の影響

Fig. 10に示すように、0.3 mg/100 gのコルヒチン投与によって、胆汁量はほとんど変化を示さなかった。しかし胆汁中に排泄されるHRPの量は有意に減少した(Fig. 11)。一方これに対して、3.5 mg/100 gのモネンシン及び5 mg/100 gのクロロキン投与では、胆汁量及び胆汁中のHRP量は有意の低下を示さなかった(Fig. 12)。コルヒチン投与に対する対照群がルミコルヒチンの腹腔内投与であるのに対しサイトカラシンBのそれは0.2% DMSO 生理食塩水の門脈からの持続注入であることから、サイトカラシンB投与に対する対照群の胆汁量の排泄パターンは、コルヒチンのそれと異なっているが、サイトカラシンB投与では対照群に比して胆汁量の著明な低下が認められた(Fig. 13)。し

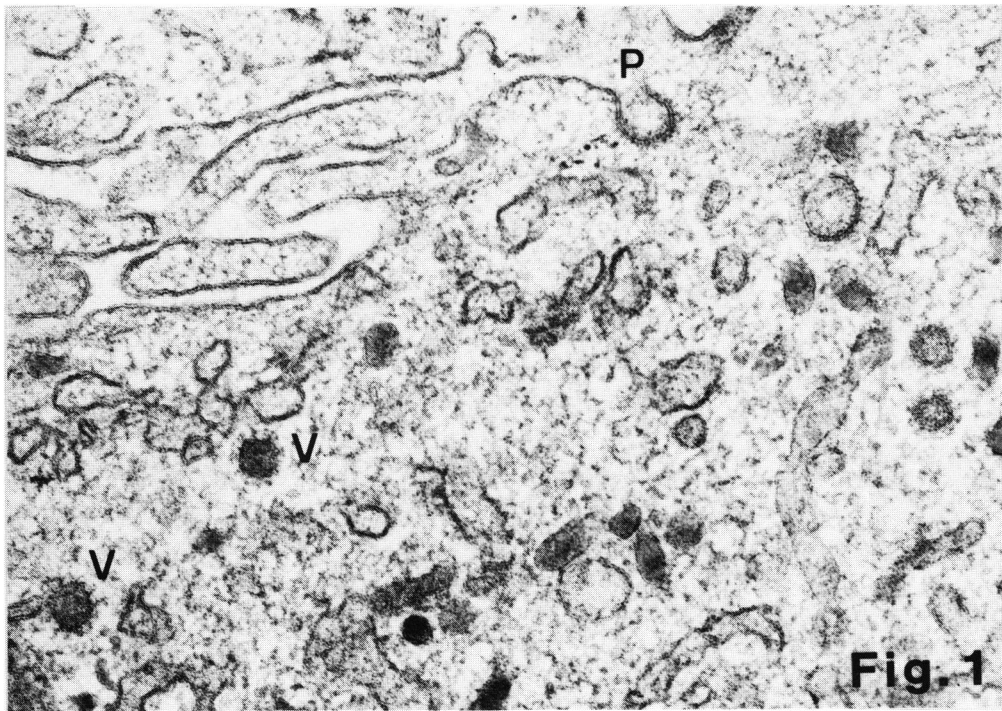


Fig. 1 Sinusoidal aspect of rat hepatocyte 1 min after HRP administration. HRP is observed in the coated pits (P) and coated vesicles (V). DAB cytochemistry. ($\times 68,000$)

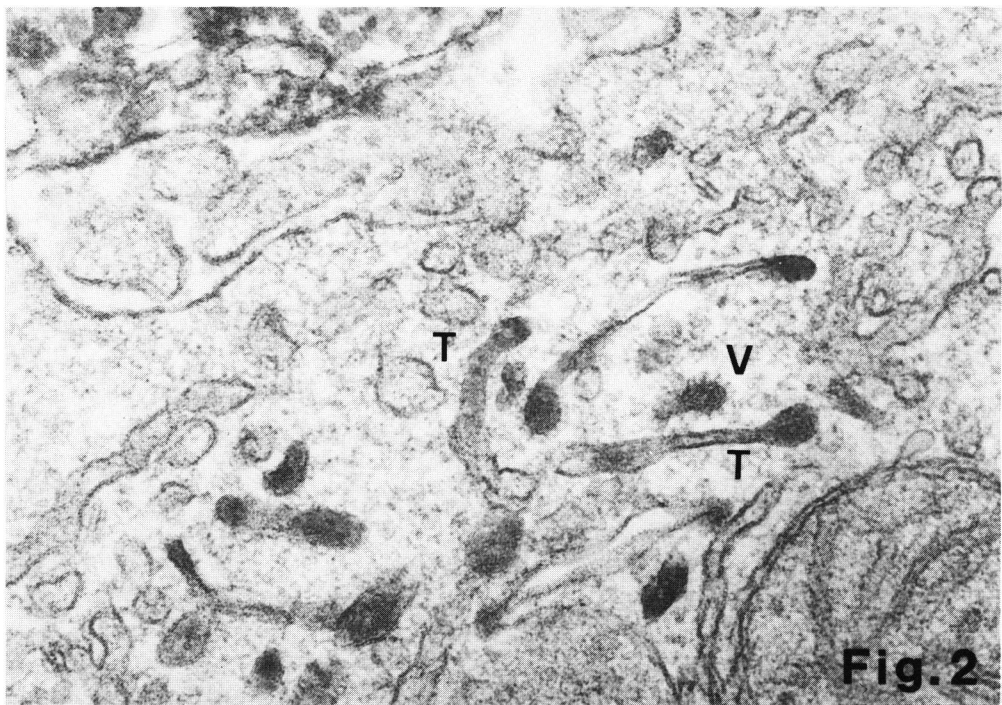


Fig. 2 Rat hepatocyte 1 min after HRP administration. HRP is seen in coated vesicles (V) and smooth surfaced tubules (T). DAB cytochemistry. ($\times 72,000$)

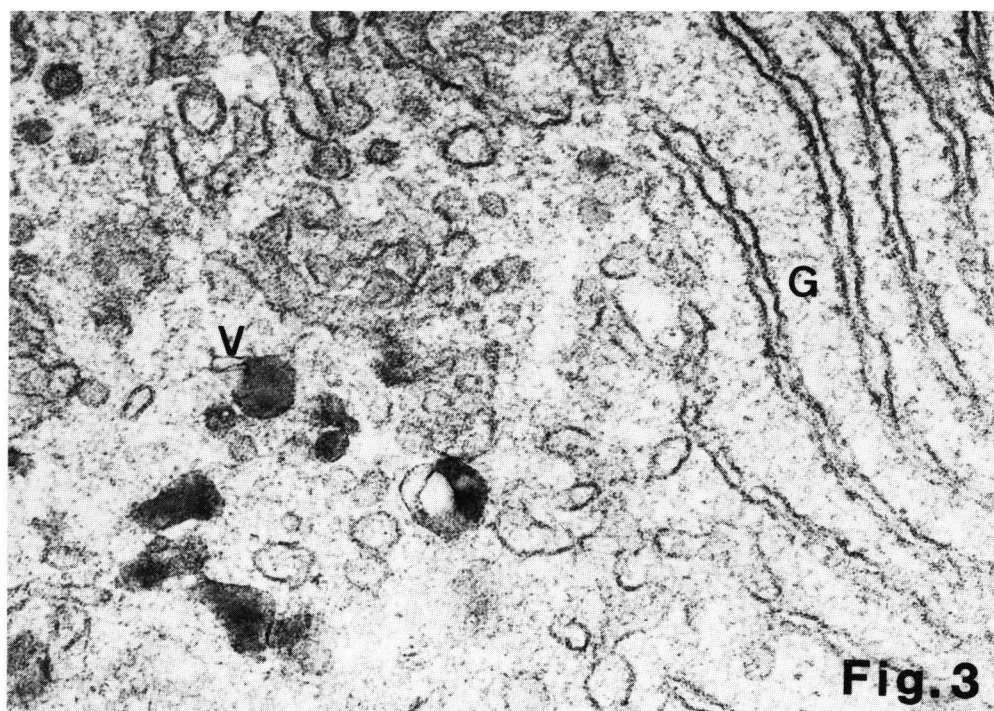


Fig. 3 Rat hepatocyte 10 min after HRP administration. HRP is not found in the Golgi cisternae (G). HRP is seen in the vesicles (V). DAB cytochemistry. ($\times 72,000$)

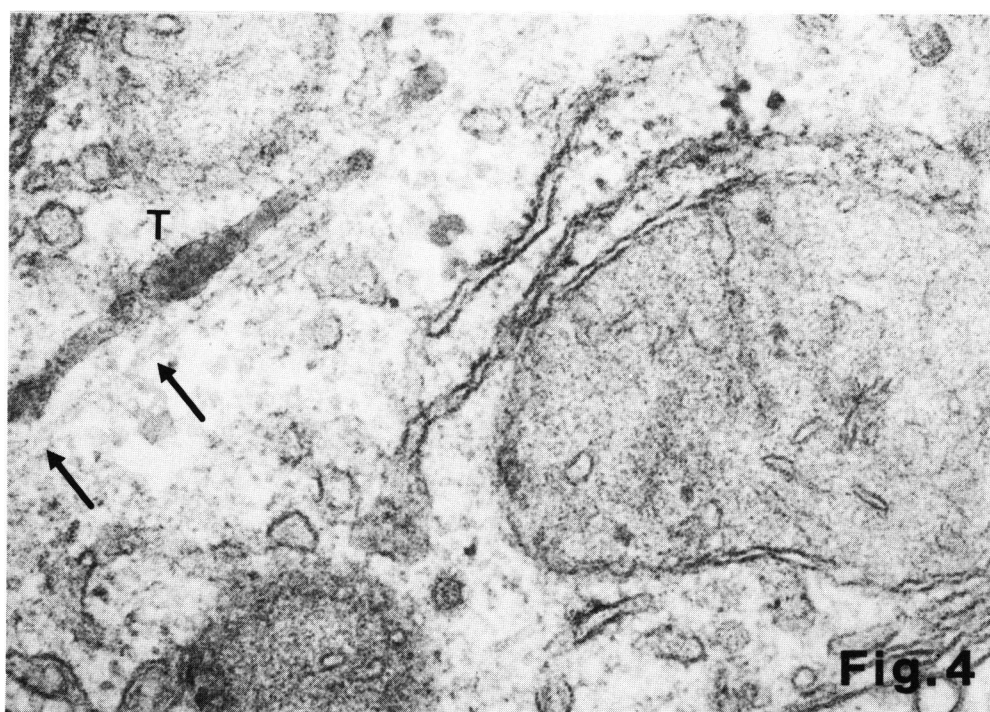


Fig. 4 Association of a cytoplasmic microtubule (arrows) and a tubular vesicle (T) containing HRP. DAB cytochemistry. ($\times 68,000$)

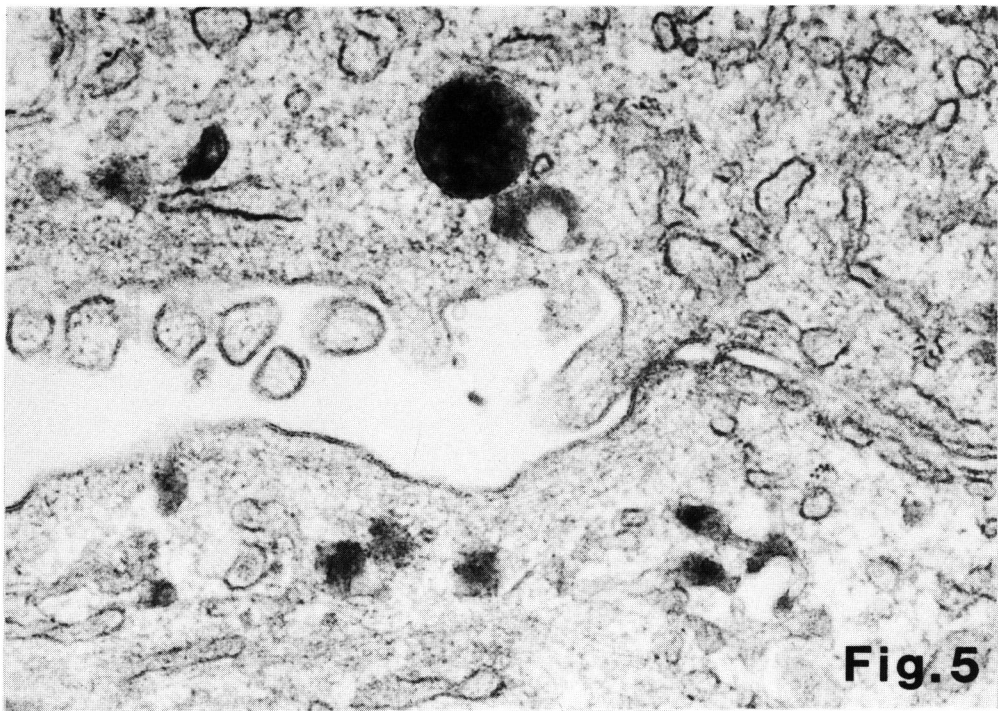


Fig. 5 HRP is seen near the bile canaliculus at 10 min after injection. DAB cytochemistry. ($\times 60,000$)

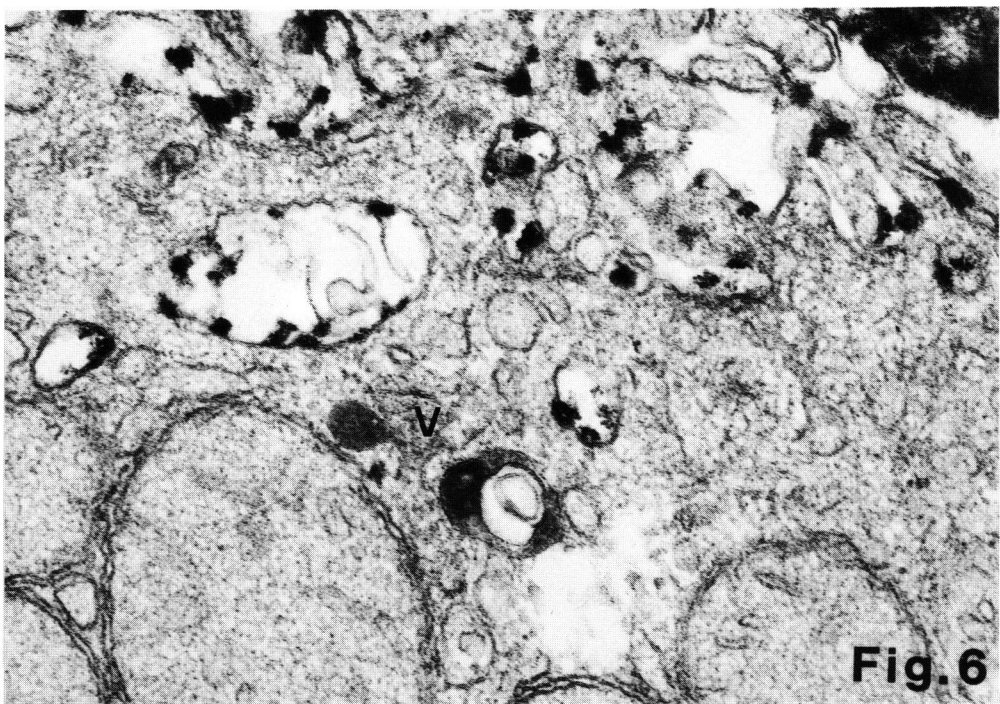


Fig. 6 AMPase activity is seen in the coated pit but not in the HRP-containing vesicles (V). AMPase and DAB cytochemistry. ($\times 76,000$)

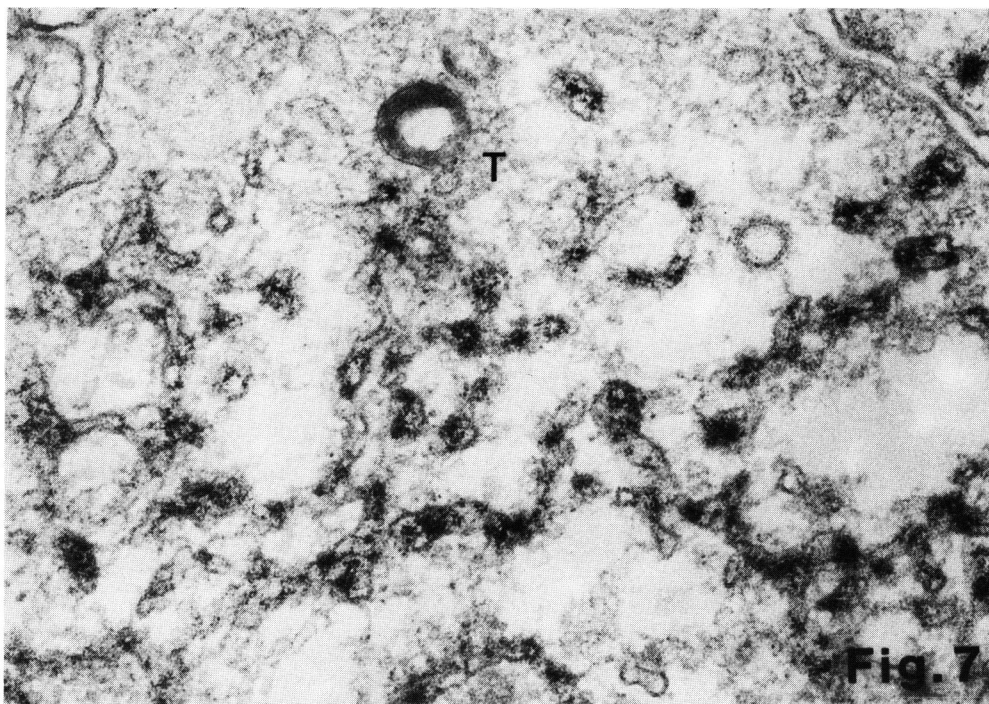


Fig. 7 G6Pase activity is present in the smooth endoplasmic reticulum and absent in the HRP-containing tubules (T). G6Pase and DAB cytochemistry. ($\times 70,000$)

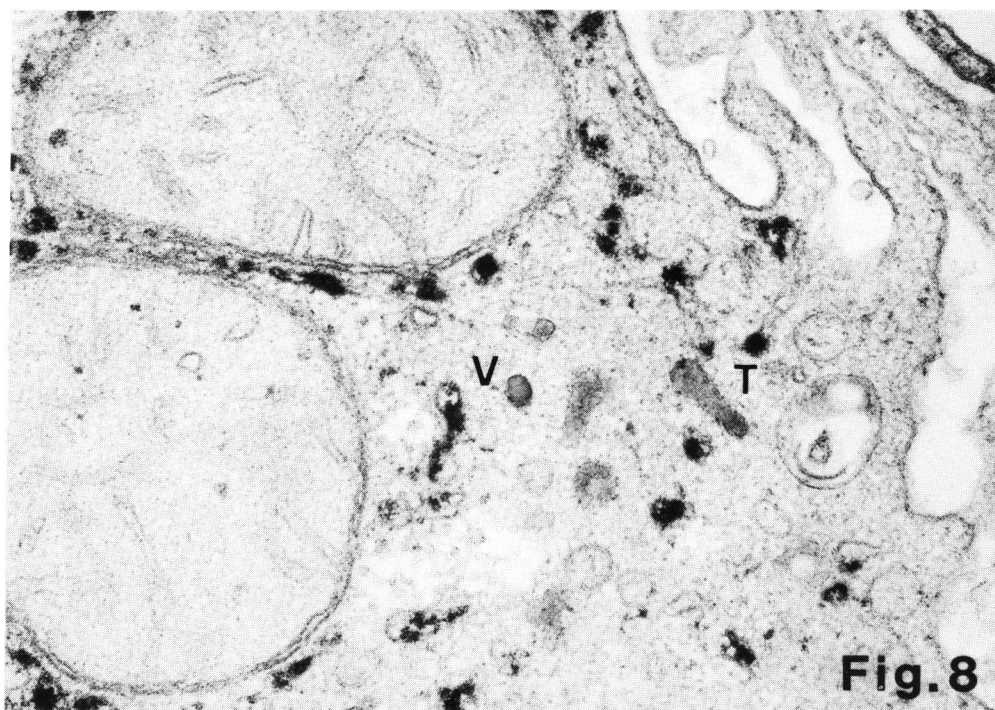


Fig. 8 TPPase activity is seen weakly in the endoplasmic reticulum, but not in the HRP-containing vesicles (V) and tubules (T). TPPase and DAB cytochemistry. ($\times 68,000$)

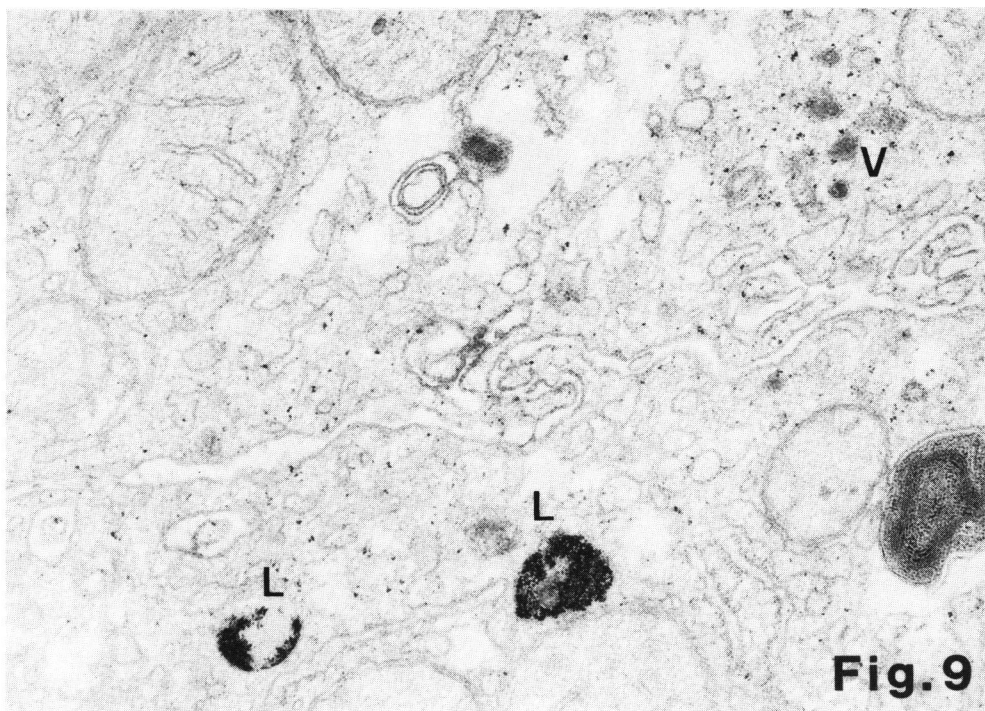
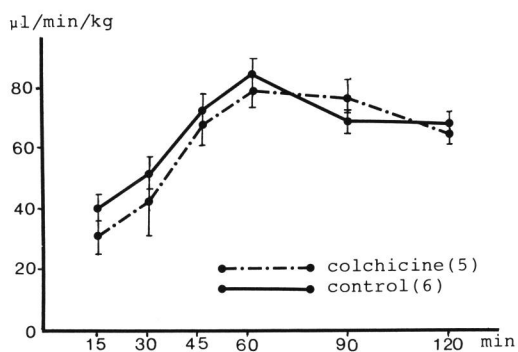
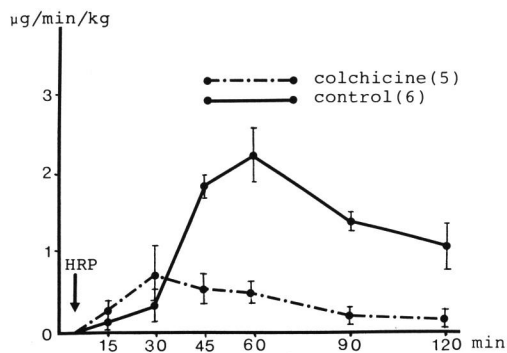
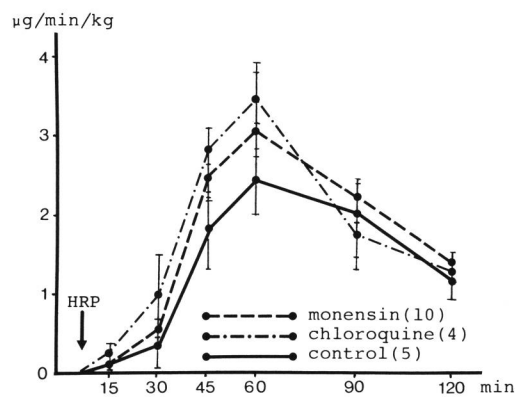
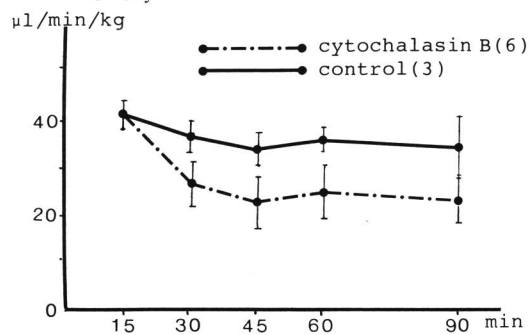
**Fig. 9**

Fig. 9 AcPase activity is seen in the lysosomes (L), but not in the HRP-containing vesicles (V). AcPase and DAB cytochemistry. ($\times 44,000$)

**Fig. 10** Effect of colchicine on the bile flow.**Fig. 11** Effect of colchicine on the biliary excretion of HRP.**Fig. 12** Effect of monensin and chloroquine on the biliary excretion of HRP.**Fig. 13** Effect of cytochalasin B on the bile flow.

かし、それにもかかわらず HRP 量には有意の減少をみなかった(Fig. 14). コルヒチン投与後 4 時間の肝細胞では、細胞質の微小管が著しく減少し、電顕的にこれを認める事が極めて困難であった. モネンシン投与後 6 時間、クロロキン投与後 6 時間及びサイトカラシン B 2 時間投与時の肝細胞の変化は、それぞれ(Fig. 15-17)に示すとおりである. モネンシン投与群では、ゴルジ装置の著明な腫大がみられ、クロロキン投与群ではライソソームの空胞状の腫大が認められたが、他の小器官には変化を認めなかった. 一方サイトカラシン B 投与群では、一部の毛細胆管の微絨毛の減少を伴う拡張と、その周囲のマイクロフィラメントの減少をみた.

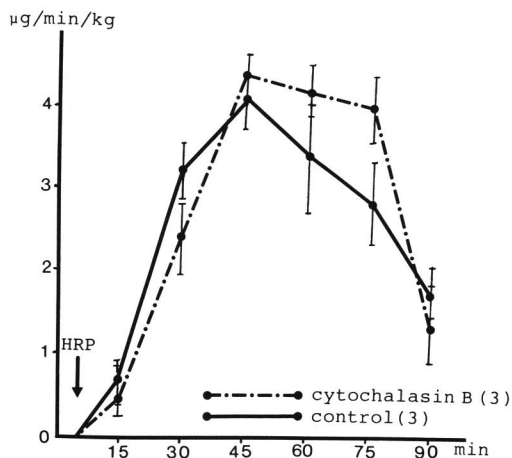


Fig. 14 Effect of cytochalasin B on the biliary excretion of HRP.

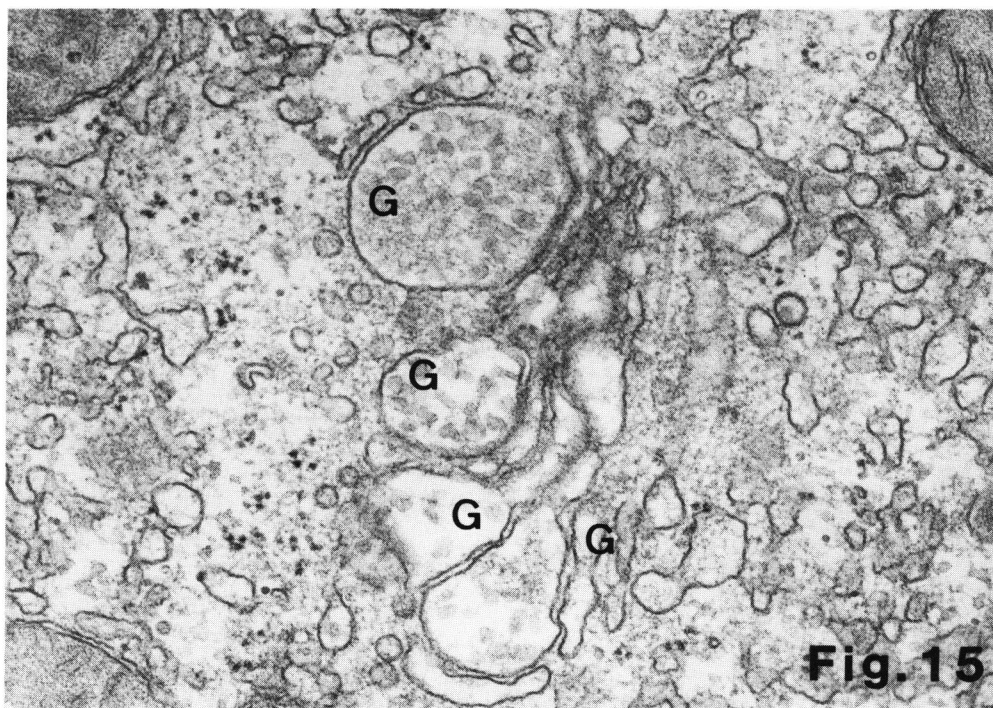


Fig. 15 Rat hepatocyte 6 hrs after monensin administration. Marked dilatation of the Golgi apparatus (G) is seen. ($\times 46,000$)

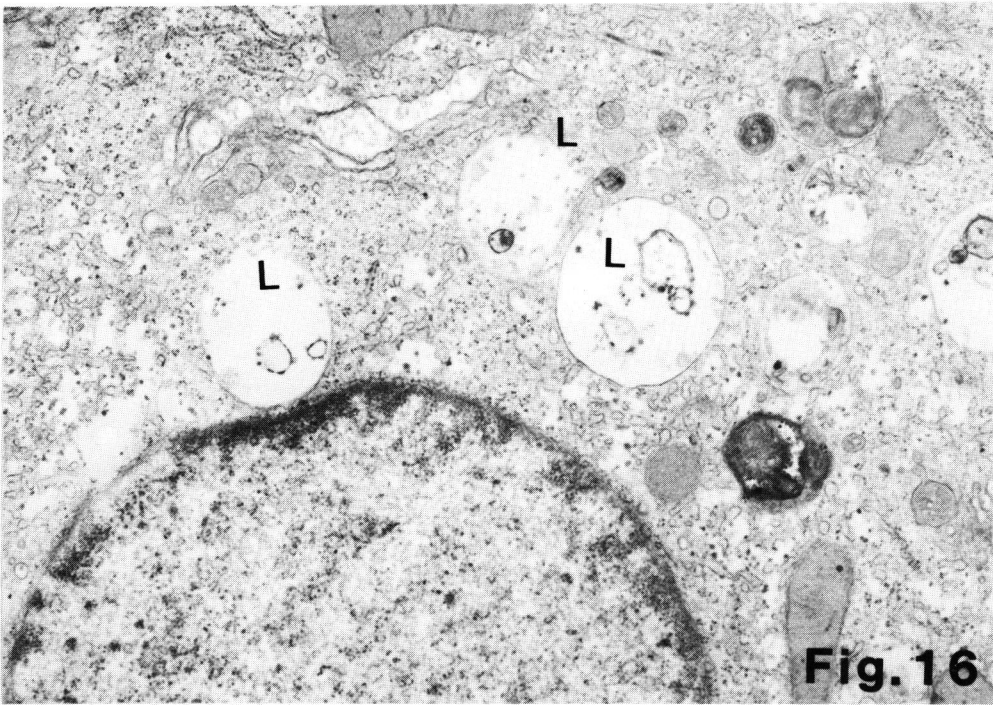


Fig. 16 Rat hepatocyte 4 hrs after chloroquine administration. Lysosomes (L) are conspicuously swollen. ($\times 17,000$)

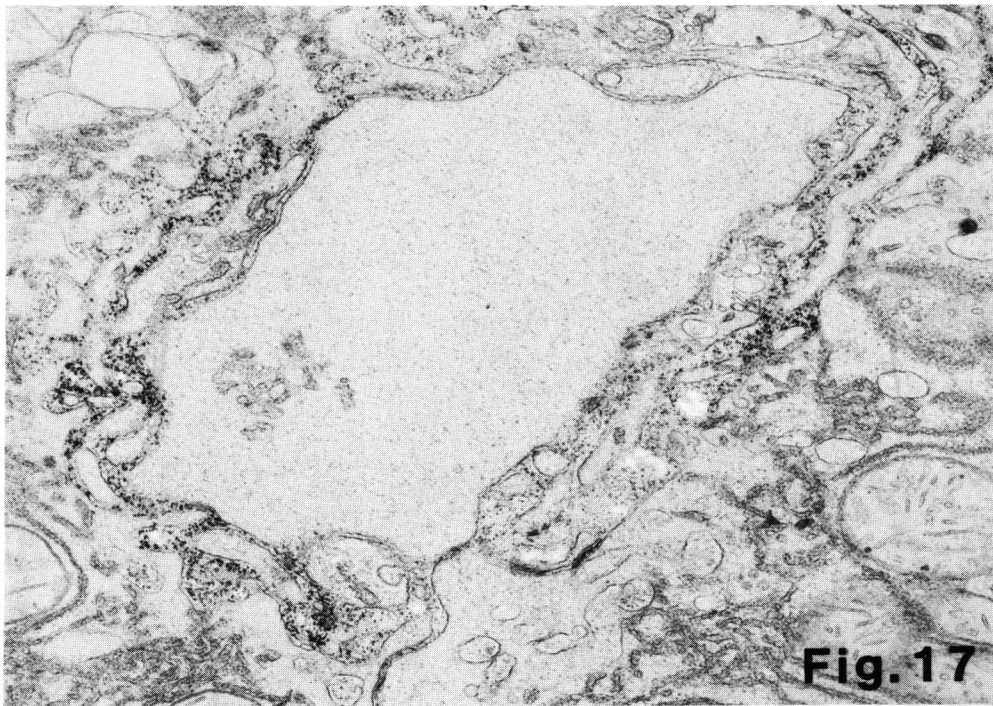


Fig. 17 Bile canicular portion of rat hepatocyte after cytochalasin B infusion for 2 hrs. The widely dilated bile canaliculus with loss of microvilli is seen. AMP cytochemistry. ($\times 20,000$)

4 考 察

緒言にも述べたように、近年胆汁内に多くの蛋白質が見出されている。その中には、血液に由来する IgA やインスリン、CEA などが含まれ、血中の蛋白質が肝細胞を經由して、胆汁中に移動する経路の存在が示唆されている。しかし、これらの物質の肝細胞による取り込み、肝細胞内輸送及び胆汁中への排泄の機構は、まだ充分には明らかにされていない。

HRP は、Graham and Karnovsky¹³⁾ によって光顕的及び電顕的に可視化が可能にされて以来、トレーサーとして広く用いられて来た糖蛋白である。HRP は血中に投与されると主に網内系細胞に貪食されるが^{20,21)}、その一部は肝細胞に入って胆汁中に排泄されることが知られている^{22,23)}。そこで本研究では、HRP の電顕的組織化学を行なって HRP 投与後のラット肝を経時的に検索し、HRP の肝細胞による取り込み、肝細胞内輸送経路及び胆汁内への排泄の過程に、肝細胞の小器官がどのようにかかわっているかを検討した。

HRP は肝細胞表面の coated pit とよばれる凹みに高濃度を集まり、次いで coated vesicle³⁹⁾ に包まれて細胞内に取り込まれる様子が電顕的に観察された。Renston *et al.*¹²⁾ や Jones *et al.*⁴¹⁾ は、HRP が coat を持たない平滑な vesicle に取り込まれると報告しているが、今回の我々の観察では、HRP を入れた vesicle の大部分に coat が認められ、coated vesicle を介する取り込みが主体をなすものと考えられた。同様な HRP の coated vesicle による取り込みは、Mori and Novikoff⁴²⁾ によって、部分切除後の肝細胞でも見出されている。組織化学的検索では、coated pit に陽性を示す AMPase の反応産物は、ごく少数の coated vesicle にしか認められなかった。このことは、coated pit の膜が(coat の主成分である clathrin の conformation の変化によって³⁹⁾細胞内にくびれ込むに伴って、速やかに細胞膜の性格を失うことを示していると考えられる。次いで HRP は表面平滑な vesicle や tubule の中に見出されるが、これらの膜構造と coated vesicle の間には、しばしば連続像が認められた(Fig. 2)。HRP を入れた vesicle や tubule は滑面小胞体の近くに見出され、形態学的には滑面小胞体に極めて類似していた。しかし肝細胞体のマーカー酵素である G6Pase の反応産物が証明されないことから、小胞体とは異なる性質のものと考えられる。しかし G6Pase の反応産物は小胞体腔内に高濃度に存在するので、HRP が存在しても確認できないという可能性も否定できない。そこで、G6Pase

と同じく小胞体腔に存在するが、その活性が低く、もし HRP が存在すればその density を認め得る、TPPase の酵素組織化学を行なった材料についても入念に観察したが、HRP と TPPase の共存は見出されなかった。表面平滑な tubular な小器官には、ゴルジ装置及びこれに近接する GERL (Novikoff)⁴⁰⁾があるが、これらの小器官のマーカー酵素である TPPase 及び acPase は、HRP を入れた tubule には証明されなかった。

HRP がライソソームを經由するか否かについて、組織化学的に解析することは困難であった。ライソソームは元来電子密度の高い物質を含んでおり、その中に HRP が含まれているか否かを判定することが困難だからである。Kacich *et al.*⁴³⁾ は、HRP の投与早期には、HRP が vesicular transport によって、ゴルジ装置やライソソームを通らずに毛胆管に排泄されるが、HRP 投与 30 分以降には、HRP が GERL とライソソーム中に見出されると述べている。しかし我々の検索結果では、HRP 投与後 50 分でも、acPase 陽性のライソソーム中には DAB の反応産物が認められず、逆に HRP を入れた vesicle は acPase 陰性であった(Fig. 9)ことから、HRP はライソソームを經由しないものと考えられた。

この点を確認するために、ライソソームの inhibitor であるクロロキンをを用いて、HRP の胆汁中への排泄が影響を受けるかどうかを検討した。クロロキンはライソソームの pH を変化させることによってライソソーム酵素の活性を失わせる。5 mg/100 g のクロロキンをラットに投与すると、肝細胞のライソソームは著明に腫大するが、このような状態でも、HRP の胆汁中への排泄量は、対照群と有意な差異を示さなかった。ことに Kacich *et al.*⁴³⁾ が指摘する HRP 投与後期にも変化がみられないことから、少なくともライソソームは、HRP の胆汁中への排泄に大きな役割は果していないものと考えられる。更に Na, K イオンの透過性を変えることによってゴルジ装置を著明に腫大させ²⁹⁾、機能的にはゴルジ装置での糖添加を障害³⁰⁾することが知られているモノニンを投与した動物でも、胆汁中への HRP の排泄量が低下しない(Fig. 12)ことから、ゴルジ装置も、HRP の肝細胞内輸送の主な経路として働いていないものと考えられた。

これらの結果から、HRP は肝細胞の coated pit から coated vesicle 内に取り込まれ、間もなく coat を失った tubular な膜系に移行して、細胞内に存在する小胞体やゴルジ装置、ライソソーム、GERL などの既存の小

器官を bypass しながら毛細胆管に向かって移動し、exocytosis によって胆汁中に排泄される可能性が示唆された。

形態学的にも、HRP を入れた tubule に沿ってしばしば微小管が認められ、両者の密接な関係が示唆されたが、コルヒチンを投与されたラットでは、胆汁量がほとんど変化を受けないにもかかわらず、胆汁中に排泄される HRP 量は著明に減少した。コルヒチンの投与によって、肝細胞の細胞質基質における微小管の volume density が低下することが報告されており^{44,45)}、一方胆汁中への HRP の排泄の減少は、ルミコルヒチンの投与では起きないことから、HRP の細胞内輸送には微小管が強く関与していることが示唆された。

微小管と共に細胞骨格を形成するマイクロフィラメントは、Phillips *et al.*⁴⁶⁾、Oda and Phillips⁴⁷⁾ の報告に一致して、サイトカラシン B 投与により著明に減少し、それにもなまって胆汁量が著明に減少した。しかしそれにもかかわらず、胆汁中に排泄される HRP 量には有意な変化をみなかった。このことから、HRP の細胞内輸送には、アクチンフィラメントは大きな役割を果たしていないものと考えられた。

5 結 語

5・1 静脈内に投与された HRP は胆汁中に排泄されるが、HRP は、coated pit から coated vesicle を介して肝細胞に取り込まれ、小胞体、ゴルジ装置、ライソソームや GERL などの既存の小器官を bypass し、細胞膜に由来する膜に包まれて細胞内を移動し、exocytosis によって毛細胆管に排泄されることが示唆された。

5・2 HRP の胆汁中への排泄がコルヒチンによって著明に低下することから、HRP の肝細胞内輸送経路には、微小管が大きな役割を果たしているものと考えられた。

5・3 サイトカラシン B は胆汁量を著明に減少させるが、HRP の胆汁内排泄量には変化を与えなかった。

稿を終えるにあたり終始御懇篤な御指導御校閲をいただいた病理学第二講座森道夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究を進めるにあたり御協力いただいた病理学第二講座の諸先生、研究補助員の方々、特に超薄切片、電顕写真の作製に御協力いただいた鈴木恵美子氏、田中和子氏に深く感謝します。

文 献

1. Jones, A. L., Renston, R. H. and Burwen, S. J.: Uptake and intracellular disposition of plasma-derived proteins and apoproteins by hepatocytes. *Prog. Liver Dis.* **7**, 51-69 (1982).
2. Kakis, G. and Yousef I. M.: Protein composition of rat bile. *Can. J. Biochem.* **56**, 287-295 (1978).
3. LaRusso, N. F.: Proteins in bile: How they get there and what they do. *Amer. J. Physiol.* **247**, 199-205 (1984).
4. Mullock, B. M., Dobrota, M. and Hinton, H. H.: Sources of the proteins of rat bile. *Biochim. Biophys. Acta* **543**, 497-507 (1978).
5. Lemitre-Coelho, I., Jackson, G. D. F. and Vaerman, J. P.: Rat bile as a convenient source of secretory IgA and free secretory component. *Eur. J. Immunol.* **7**, 588-590 (1977).
6. Fisher, M. M., Nagy, B., Bazin, H. and Underdown, B. J.: Biliary transport of IgA: Role of secretory component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2008-2012 (1979).
7. 大嶋哲夫: ヒト胆汁及び血清中 Secretory IgA に関する研究—血清 IgA の胆汁への輸送機構と血清 IgA の増量について—。札幌医誌 **54**, 233-248 (1985).
8. Bailey, C. J., Flatt, P. R., Atkins, T. W. and Matty, A. J.: Immunoreactive insulin in bile and pancreatic juice of rat. *Endocrinol. Exp. (Bratisl)* **10**, 101-111 (1976).
9. Henderson, J.: Insulin in body fluids other than blood. *Physiol. Rev.* **54**, 1-22 (1974).
10. Thomas, P. and Summers, J. W.: The biliary excretion of circulating asialoglycoproteins in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 335-339 (1978).
11. Renston, R. H., Jones, A. L., Christiansen, W. D. and Hradek, G. T.: Evidence for a vesicular transport mechanism in hepatocytes for biliary secretion of immunoglobulin A. *Science* **208**, 13-15 (1980).
12. Renston, R. H., Maloney, D. G., Jones, A. L., Hradek, G. T., Won, K. Y. and Goldfine, I. D.: Bile secretory apparatus: Evidence for a vesicular transport mechanism for proteins in the rat, using horseradish peroxidase and [¹²⁵I] insulin. *Gastroenterology* **78**, 1373-1388 (1980).
13. Graham, R. C. Jr. and Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney

- : Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 291-301 (1966).
14. Herzog, V.: Pathways of endocytosis from luminal plasma membrane in rat exocrine pancreas. *Eur. J. Cell Biol.* **21**, 141-150 (1980).
 15. Like, A. A.: The uptake of exogenous peroxidase by the beta cells of the islets of Langerhans. *Amer. J. Pathol.* **59**, 225-246 (1970).
 16. Yardley, J. H. and Brown, G. D.: Horseradish peroxidase tracer studies in the intestine in experimental chorea. *Lab. Invest.* **28**, 482-493 (1973).
 17. Herzog, V., Sies, H. and Miller, F.: Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal glands. *J. Cell Biol.* **70**, 692-702 (1976).
 18. Jones, D. G., Cameron, P. U. and Ellison, L. T.: The uptake of horseradish peroxidase by cortical synapses in rat brain. *Cell Tissue Res.* **178**, 355-373 (1977).
 19. Rhodes, J. M., Birch-Andersen, A. and Ravn, H.: Localization of horseradish peroxidase in mouse and guinea pig peritoneal macrophages after uptake in vivo and in vitro: An electron microscope study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.* **31**, 453-463 (1973).
 20. Graham, R. C. Jr., Limpert, S. and Kellermeyer, R. W.: The uptake and transport of exogenous proteins in mouse liver: Ultrastructural cytochemical studies with peroxidase tracers. *Lab. Invest.* **20**, 298-304 (1969).
 21. Fahimi, H. D., Gray, B. A. and Herzog, V. K.: Cytochemical localization of catalase and peroxidase in sinusoidal cells of rat liver. *Lab. Invest.* **34**, 192-201 (1976).
 22. Creemers, J. and Jacques, P. J.: Endocytotic uptake and vesicular transport of injected horseradish peroxidase in the vacuolar apparatus of rat liver cell. *Exp. Cell Res.* **67**, 188-203 (1971).
 23. Matter, A., Orci, L. and Rouiller, C.: A study on the permeability barriers between Disse's space and the bile canaliculus. *J. Ultrastruct. Res. Suppl.* **2** (1969).
 24. Mori, M. and Onoé, T.: The role of microtubules in the movement of lysosomes in regenerating rat liver. *J. Clin. Electron Microscopy* **12**, 515-516 (1979).
 25. 森 道夫, 小山田正人, 金子愛子, 小野江為則: インドシアニングリーンの肝細胞内輸送と微小管. *医学のあゆみ* **113**, 829-831 (1980).
 26. 森 道夫, 小山田正人, 佐藤昌明, 小野江為則: 肝細胞の微小管と疾患. *医学のあゆみ* **122**, 154-158 (1982).
 27. Mori, M.: Ultrastructural changes of hepatocyte organelles induced by chemicals and their relation to fat accumulation in the liver. *Acta Pathol. Jpn.* **33**, 911-922 (1983).
 28. Phillips, M. J., Oshio, C., Miyairi, M. and Smith, C. R.: Intrahepatic cholestasis as a canalicular motility disorder: Evidence using cytochalasin. *Lab. Invest.* 205-211 (1983).
 29. Tartakoff, A. and Vassalli, P.: Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. *J. Cell Biol.* **79**, 694-707 (1978).
 30. Griffiths, G., Quinn, P. and Warren, G.: Dissection of the Golgi complex. I. Monensin inhibits the transport of viral membrane proteins from medial to trans Golgi cisternae in baby hamster kidney cells infected with semliki forest virus. *J. Cell Biol.* **96**, 835-849 (1983).
 31. 川崎敏祐: エンドサイトーシスの受容体機構. *代謝* **20**, 17-25 (1983).
 32. Wachstein, M. and Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at physiologic pH. *Amer. J. Clin. Pathol.* **27**, 13-23 (1957).
 33. Wachstein, M. and Meisel, E.: On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 592 (1956).
 34. Ogawa, K., Minase, T., and Onoé, T.: Demonstration of glucose-6-phosphatase activity in the oval cells of rat liver and the significance of the oval cells in azo dye carcinogenesis. *Cancer Res.* **34**, 3379-3386 (1974).
 35. Novikoff, A. B. and Goldfischer, S.: Nucleosidediphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 802-810 (1961).
 36. Gomori, G.: *Microscopic Histochemistry principles and practice.* 189-194 Univ. Chicago Press (1952).
 37. Farquhar, M. G. and Palade, G. E.: Cell junction in amphibian skin. *J. Cell Biol.* **26**, 263-291 (1965).
 38. Willstater, R. and Stoll, A., *Ann.* **416**, 21 (1917). (Methods Enzymol. **2**, 773 (1955) より引用).
 39. 金関 恵: エンドサイトーシスの形態学. *代謝* **20**, 107-114 (1983).
 40. Novikoff, A. B. and Novikoff, P. M.: Cytochemical contributions to differentiating GERL from the Golgi apparatus. *Histochem. J.* **8**, 525-551 (1977).
 41. Jones, A. L., Schmucker, D. L., Renston, R. H. and Murakami, T.: The architecture of bile

- secretion: A morphological perspective of physiology. *Dig. Dis. Sci.* **25**, 609-629 (1980).
42. Mori, M. and Novikoff, A. B.: Induction of pinocytosis in rat hepatocytes by partial hepatectomy. *J. Cell Biol.* **72**, 695-706 (1977).
43. Kacich, R. L., Renston, R. H. and Jones, A. L.: Effect of cytochalasin D and colchicine on the uptake, translocation and biliary secretion of horseradish peroxidase and [^{14}C] sodium taurocholate in the rat. *Gastroenterology* **85**, 385-394 (1983).
44. 森 道夫, 小山田正人, 横川金弥, 奥 雅志, 山口 潤, 小野江為則: アルコール性脂肪肝と肝細胞の微小管. *医学のあゆみ* **114**, 1050-1052 (1979).
45. Mori, M., Enomoto, K., Satoh, M. and Onoe, T.: Translocation of hepatocyte lysosomes following partial hepatectomy and its inhibition by colchicine. *Exp. Cell Res.* **131**, 25-30 (1981).
46. Phillips, M. J., Oda, M., Ellen Mak, Fisher, M. M. and Jeejeebhoy, K. S.: Microfilament dysfunction as a possible cause of intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **69**, 48-58 (1974).
47. Oda, M. and Phillips, M. J.: Bile canalicular membrane pathology in cytochalasin B-induced cholestasis. *Lab. Invest.* **37**, 350-356 (1977).

別刷請求先:

(〒 060) 札幌市中央区南 1 条西 17 丁目

札幌医科大学病理学第 2 講座 山口 潤